

論文の内容の要旨

論文題目：脳・精巣特異的転写伸長因子 SII-T1 の機能解析

氏名：中田 章仁

【序】

転写伸長因子 S-II は当教室において、RNA ポリメラーゼ II の RNA 合成促進活性を指標に精製されたタンパク質である。in vitro における解析により、S-II は転写途中に鋳型 DNA 上で停止した RNA ポリメラーゼ II による mRNA 鎖の伸長反応の再開を促すはたらきを有することが示されている。哺乳類の S-II には全身に発現するタイプの他に、精巣で発現する SII-T1、および心臓・肝臓・腎臓・骨格筋で発現する SII-K1 の 2 つの組織特異的なタイプが存在する(Fig.1)。

当教室におけるこれまでの研究から、SII-T1 は精子形成過程の精母細胞に特異的に発現することが mRNA レベルで示されている。しかし、SII-T1 の精子形成における役割、特に転写因子としてはたらく分子メカニズムは全く明らかになっていない。

最近、当教室において、全身に発現するタイプの S-II が組織特異的転写因子 FESTA と結合することにより、転写活性化に寄与することが示された。この結果から、私は精巣特異的に発現する SII-T1 は精巣特異的転写因子との相互作用を介して遺伝子発現制御を行なっていると考えた。本研究において、私は SII-T1 の生理機能を理解するために、「SII-T1 ノックアウトマウスの樹立と解析」、および「SII-T1 と相互作用する転写因子の同定と解析」という 2 つのストラテジーを採ることとした。

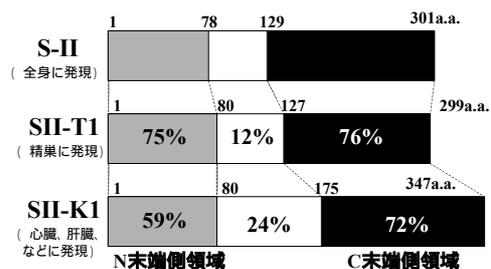


Fig.1. マウス S-IIファミリー
数字は各領域のS-IIのそれにあたる領域との相同性を示す。

【方法と結果】

1. SII-T1 遺伝子ノックアウトマウスの樹立と解析

SII-T1 が精子形成に果たす役割を個体レベルで明らかにするために、まず SII-T1 遺伝子ノックアウトマウスの作出を試みた。マウス SII-T1 遺伝子の破壊に用いたターゲティングベクターは、SII-T1 遺伝子の第一エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換するように設計した(Fig.2)。樹立した SII-T1 ヘテロノックアウトマウスは生存可能であり、妊性も正常であった。そこで、SII-T1 ヘテロノックアウトマウス同士の交配を行ない、得られた次世代マウスについて、サザンブロット解析によって遺伝子型判定を行なった。その結果、各遺伝子型マウスの割合はほぼメンデルの法則にしたがっていたことから、SII-T1 ノックアウトマウスは生存可能であることが明らかになった。

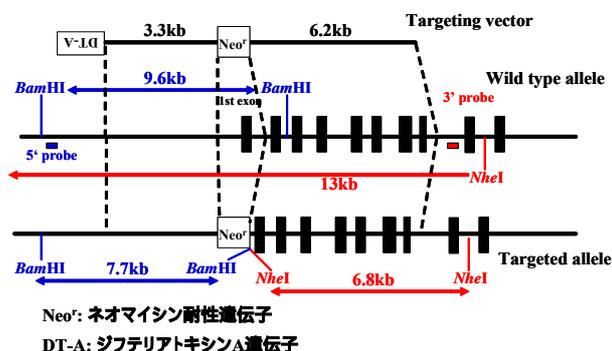


Fig.2 SII-T1遺伝子のターゲティングストラテジー

	No. of live births	No. of litters	Average of litter sizes
-/- () × +/+ ()	41	5	8.2
-/- () × -/- ()	32	5	6.4
+/- () × +/- ()	38	5	7.6

Table.1. SII-T1ホモノックアウトマウスは生殖能力を有する

SII-T1 遺伝子が精子形成過程の精母細胞に特異的に発現していることから、次に SII-T1 ノックアウトマウス (雄) が生殖能力に異常を示すか否かについて、野生型マウス (雌) との交配によって調べた。その結果、SII-T1 ノックアウトマウス (雄) は生殖能力を有しており、野生型マウス (雄) のそれとほとんど差がないことが明らかになった(Table.1)。

2. SII-T1 と相互作用する転写因子の探索

SII-T1 の生理機能の解明に迫る手がかりをつかむために、私は SII-T1 と相互作用する転写因子を同定し、SII-T1 が転写にはたらく分子機構を解析することにした。マウス SII-T1 のアミノ酸 1-180 の領域を bait とした yeast two-hybrid 法によって、マウス精巣 cDNA ライブラリーから SII-T1 と結合するタンパク質の単離を試みた。その結果、陽性クローンとして GRIP1(25 クローン)、ACT (3 クローン)、TRABID (1 クローン)、NAP (1 クローン) の 4 種類の遺伝子を単離することに成功した。

3. SII-T1 と PDZ タンパク質 GRIP1 の新規アイソフォーム GRIP1 τ の相互作用

2.の yeast two-hybrid 法による探索では、GRIP1 のクローンが最も多く単離された。このタンパク質は、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインとして知られている PDZ ドメインを 7 個有しており (Fig.3 , 最上段) , 脳・精巣において

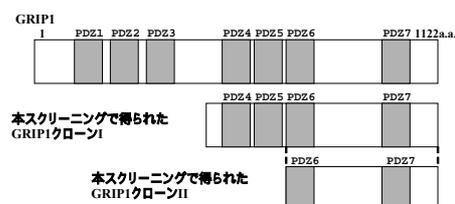


Fig.3. yeast two-hybrid法で得られたGRIP1クローン

で発現していることが報告されている。さらに、GRIP1 は脳の神経細胞で AMPA 型グルタミン酸受容体と細胞質側で結合し、細胞膜上でのグルタミン酸受容体のクラスター形成にはたらくこと

が知られている。また、GRIP1 が核内にも存在し、転写因子と相互作用するという報告もある。以上のことから、私は精巣において GRIP1 が SII-T1 と相互作用し、転写因子としてはたらくのではないかと考えた。

本研究におけるスクリーニングで得られた GRIP1 クローンは、PDZ ドメインを 7 個有するタイプではなく、GRIP1 の C 末端側の PDZ ドメイン 4 個を含む領域をコードするクローン I (Fig.3, 中段)、および C 末端側の PDZ ドメイン 2 個を含む領域をコードするクローン II (Fig.3, 最下段) の 2 種類であった。これら短いタイプの GRIP1 が精巣において発現しているという報告がなかったため、この点について、データベースを再検索することにより検証した。その結果、クローン I に相当するマウス全長型 cDNA クローン (AK016420 他複数) が存在することが判明した。さらに、抗 GRIP1 抗体を用いた精巣、脳のウエスタンブロット解析により、クローン I に相当するバンドが精巣特異的に検出された。したがって、精巣には、PDZ ドメイン 7 個型の GRIP1 に加えて、クローン I に相当する PDZ ドメイン 4 個型の GRIP1 も発現していると考えられる。今回同定した GRIP1 の精巣特異的新規アイソフォームを GRIP1 τ と名づけた。

次に、SII-T1 と GRIP1 τ が細胞内で結合していることを検証するために、COS7 細胞に Xpress エピトープタグを付加した SII-T1 と FLAG エピトープタグを付加した GRIP1 τ を共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、FLAG-GRIP1 τ の導入依存に、FLAG-GRIP1 と Xpress-SII-T1 の共沈降物が検出された (Fig.4)。したがって、SII-T1 と GRIP1 τ が哺乳類細胞内で結合すると考えた。

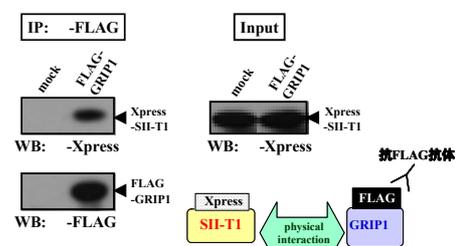


Fig.4. SII-T1とGRIP1 が細胞内で結合する (抗FLAG抗体による免疫沈降(COS7細胞))

また、本スクリーニングでは、GRIP1 τ をコードするクローン I の他に、より短いクローン II も得られたことから、SII-T1 と GRIP1 τ の結合には、GRIP1 τ の C 末端側の 2 個の PDZ ドメインを含む領域 (アミノ酸 257-632) があれば十分であると考えられる (Fig.3)。

4. SII-T1 のマウス脳における発現

GRIP1 が脳の神経細胞において重要な役割を担っていることから、SII-T1 が脳においても発現している可能性を考えた。そこで、抗マウス SII-T1 抗体を作製し、それを用いてマウス脳についてウエスタンブロット解析を行った。その結果、SII-T1 が精巣だけでなく、脳 (大脳、小脳) においても発現していることが判明した (Fig.5)。

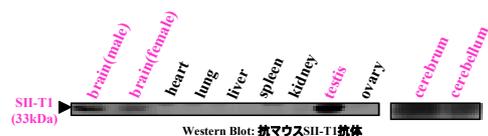


Fig.5. SII-T1は精巣だけでなく脳にも発現している

5. GRIP1 τ の転写活性化能の解析

GRIP1 は神経細胞で転写因子 Dlx2 と結合することが報告されている。しかし、GRIP1 自身が転写因子としてはたらくか否かについては不明であった。一方、本研究の yeast two-hybrid 法による探索で単離された GRIP1 クローンの中には、GAL4-Activation Domain (GAL4-AD) と融合していないクローン、GAL4-AD の向きと逆向きの GRIP1 τ クローンが存在した。通常、yeast two-hybrid 法では、酵母細胞内で用いたライブラリー由来のタンパク質と GAL4-AD との融合タンパク質が発

現し,それが bait タンパク質と結合するとき,陽性を呈する。以上のことから,私は GRIP1 τ 自身が細胞内で転写活性化能を発揮しているのではないかと考えた。その点を検証するために,GAL4 DNA Binding Domain(GAL4DBD)と GRIP1 τ の融合タンパクの発現ベクター,および GAL4 結合配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターベクターをマウス胎児繊維芽細胞株に導入し,レポーター活性を測定した。その結果,GAL4DBD-GRIP1 τ ベクター依存にレポーター活性が約 14 倍上昇することがわかった (Fig.6, 7)。さらに,そのレポーター活性の上昇に必要な GRIP1 τ の領域を知るために,GAL4DBD-GRIP1 τ の様々な変異体を用いた解析を行った。その結果,アミノ酸 508 以降の領域 (PDZ4 を含む領域, Fig.6) を欠いた変異体では約 6 倍のレポーター活性の上昇が検出されたのに対して,アミノ酸 340 以降の領域(*および PDZ4 を含む領域, Fig.6) を欠いた変異体では活性の上昇が検出されなかった(Fig.6, 7)。したがって,哺乳類細胞内で GRIP1 τ 自身が転写活性化能を有し,その活性化にはアミノ酸 340-507 の領域 (*の領域, Fig.6) が必要であることがわかった。

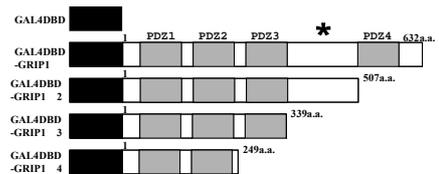


Fig.6. レポーターアッセイに用いた GAL4DBD-GRIP1 の欠損変異体

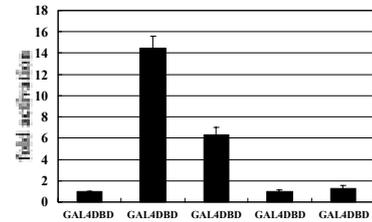


Fig.7. GAL4DBD-GRIP1 は転写活性化能を有する

6. SII-T1 による GRIP1 τ の転写活性の調節

SII-T1 が GRIP1 τ と結合するという結果から,私は SII-T1 が GRIP1 τ の転写活性を制御するのではないかと考えた。そこで,5. の GAL4DBD-GRIP1 τ のレポーターアッセイ系に SII-T1 発現ベクターを導入し,GRIP1 τ の転写活性が影響を受けるか否かを調べた。その結果,GAL4DBD-GRIP1 τ ベクター量が 10ng のときには,SII-T1 ベクター依存に最大約 2 倍のレポーター活性の上昇が見出された(Fig.8A)。一方,GAL4DBD-GRIP1 τ ベクター量が 25ng のときには,SII-T1 ベクター依存に最大約 50%の活性が消失するという結果が得られた(Fig.8B)。以上の結果から,SII-T1 は GRIP1 τ の量に応じてその転写活性化能を正または負に調節している。

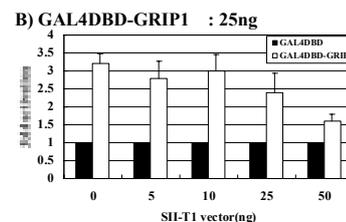
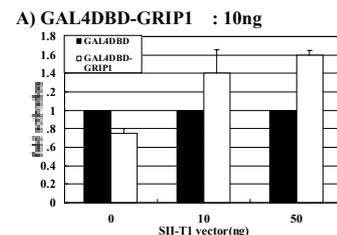


Fig.8. GAL4DBD-GRIP1 による転写活性化に対するSII-T1の影響

【まとめと考察】

本研究において私は,SII-T1 の精子形成における役割を個体レベルで知ることがを目的として,SII-T1 ノックアウトマウスを樹立し,それが通常の条件下では生存,生殖能力に異常を示さないことを明らかにした。また,SII-T1 が転写にはたらく分子機構を理解することを目的として,SII-T1 が PDZ タンパク質 GRIP1 の精巢特異的新規アイソフォーム GRIP1 τ と結合すること,GRIP1 τ 自身が哺乳類細胞内で転写活性化能を有すること,および SII-T1 が GRIP1 τ の転写活性化能を正あるいは負に調節していることを明らかにした。さらに,SII-T1 が精巣だけでなく,脳にも発現していることを明らかにした。

PDZ タンパク質 GRIP1 には、本研究において新たに同定した精巣特異的に発現するアイソフォーム・GRIP1 τ の他に、脳特異的に発現するアイソフォーム・GRIP1b が存在する。GRIP1 τ 内の SII-T1 との結合領域が、GRIP1b にも存在することから、GRIP1b も SII-T1 と相互作用すると考えられる。以上のことから、SII-T1 は精巣では GRIP1 τ と、脳では GRIP1b と協調して、標的遺伝子の転写にはたらくと考えている。

SII-T1 ノックアウトマウスについて、現在のところ変異表現型は見出されていない。しかし、本研究において示唆したこと、すなわち、SII-T1 が PDZ タンパク質 GRIP1 と協調して転写反応にはたらくこと、および SII-T1 が精巣だけでなく、脳にも発現していることを SII-T1 ノックアウトマウスの変異表現型解析にフィードバックすることにより、SII-T1 の新しい生理的役割の解明に迫ることができると考えている。